

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
 PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
 Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
 2. Oktober 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
 WO 03/080859 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/02,  
 1/26, 1/527, 1/48, A61P 43/00

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-  
 SELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/02846

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
 19. März 2003 (19.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
 102 13 332.8 25. März 2002 (25.03.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GROSSMANN, Klaus [DE/DE]; Mainstr. 1, 67141 Neuhausen (DE). SCHIFFER, Helmut [DE/DE]; Am Hofstück 25, 67483 Grossschillingen (DE). WITSCHEL, Matthias [DE/DE]; Höhenweg 12b, 67098 Bad Dürkheim (DE). ZAGAR, Cyrill [DE/DE]; Untere Clignetstr. 8, 68167 Mannheim (DE). RENTZEA, Costin [DE/DE]; Richard-Kuhn-Str.1-3, 69123 Heidelberg (DE). MENGES, Markus [DE/DE]; Birkenkopfstr. 41, 34132 Kassel (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE, INDOLE-3-PYRUVATE DECARBOXYLASE AND INDOLE-3-ACETALDEHYDE OXIDASE AS NOVEL TARGETS FOR HERBICIDES

(54) Bezeichnung: TRYPTOPHANAMINOTRANSFERASE, INDOL-3-PYRUVATDECARBOXYLASE UND INDOL-3-ACETALDEHYDOXIDASE ALS NEUE TARGETS FÜR HERBIZIDE

(57) Abstract: The invention relates to tryptophan aminotransferase, indole-3-pyruvate decarboxylase and indole-3-acetaldehyde oxidase as novel targets for herbicides. The invention also relates to test methods for identifying inhibitors of one or more of the aforementioned enzymes with a herbicidal action, to inhibitors with a herbicidal action that have been identified by said method and to methods for controlling undesired plant growth, based on the inventive inhibitors.

(57) Zusammenfassung: Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide Zusammenfassung Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide, Testverfahren zur Identifizierung herbizid wirkender Inhibitoren von einem oder mehreren der vorstehend genannten Enzyme, die über dieses Verfahren identifizierten Inhibitoren mit herbizider Wirkung, sowie Verfahren zur Bekämpfung unerwünschten Pflanzenwachstums auf Basis der erfindungsgemäßen Inhibitoren.

WO 03/080859 A1

Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide

## 5 Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide, Testverfahren zur Identifizierung herbizid wirkender Inhibitoren von einem oder mehreren der vorstehend genannten Enzyme, die über dieses Verfahren identifizierten Inhibitoren mit herbizider Wirkung, sowie Verfahren zur Bekämpfung unerwünschten Pflanzenwuchses auf Basis der erfindungsgemäßen Inhibitoren.

15

Zum Auffinden neuer Herbizide werden die potentiellen Wirkstoffe nach konventioneller Vorgehensweise auf geeignete Testpflanzen appliziert. Diese Methode weist den Nachteil auf, dass zum Testen relativ große Substanzmengen erforderlich sind. Zum anderen werden bei der direkten Applikation auf die zu testenden Pflanzen bereits im ersten Screeningschritt äußerst hohe Anforderungen an die Testsubstanz gestellt, da nicht nur die Inhibierung oder sonstige Modulation der Aktivität eines zellulären Targets (in der Regel ein Protein oder Enzym als Wirkort für ein Herbizid) erforderlich sind, sondern die Substanz dieses Target zunächst überhaupt erreichen muss. Bereits in diesem ersten Schritt muß die Testsubstanz in Bezug auf Aufnahme durch die Pflanze, Permeabilität durch die verschiedenen Zellwände und Membranen, Persistenz zur Erreichung des gewünschten Effektes hohe Anforderungen erfüllen, ehe es schließlich Inhibierung/ Veränderung der Aktivität des gewünschten Zielenzyms kommen kann.

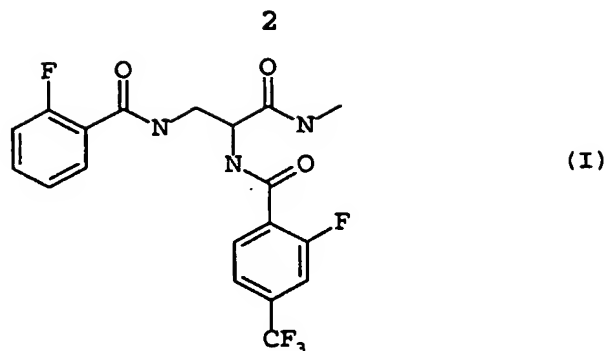
Es ist angesichts dieser Erfordernisse daher nicht überraschend, dass zum einen die Identifizierung neuer Wirkstoffe immer höhere Kosten verursacht, zum anderen immer weniger Wirkstoffe entdeckt werden.

Es war deshalb Aufgabe in der vorliegenden Erfindung, neue Targets für Herbizide zur Verfügung zu stellen.

40

Überraschender Weise wurde gefunden, dass die Synthese von Indol-3-essigsäure aus L-Tryptophan in Gegenwart von durch die Verbindung der Formel I in vitro gehemmt wird (s. Beispiel 3 und Beispiel 4).

45



10

Da Verbindungen der Formel I wirken herbizid wirken (s. Beispiel 4), sind die Tryptophan-Aminotransferase, Indol-3-pyruvat Decarboxylase und die Indol-3-acetaldehydoxidase als Targets für Herbizide geeignet.

15

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Bereitstellung von Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase als neue Targets für Herbizide. In diesem Rahmen wurden weiterhin Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung bereitgestellt, welche auf der Verwendung von einem oder mehreren Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase basieren.

25

Die Biosynthese von Indol-3-essigsäure (Auxin), einem wichtigen Pflanzenhormon, geht von L-Tryptophan aus. Die direkte Vorstufe von L-Tryptophan ist Indol. In allen höheren Pflanzenspezies wird der vom L-Tryptophan ausgehende Syntheseweg wie folgt realisiert:

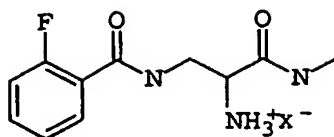
30 L-Tryptophan wird über die Tryptophan-Aminotransferase in Indol-3-pyruvat umgewandelt, welches über die Indol-3-pyruvat Decarboxylase in Indol-3-acetaldehyd umgewandelt wird. Im Anschluß katalysiert die Indol-3-acetaldehydoxidase die Umwandlung des Indol-3-acetaldehyds in Indol-3-essigsäure, die wiederum durch die

35 Indol-3-buttersäuresynthase in Indol-3-buttersäure umgewandelt wird. . Dabei liegen die Enzyme Tryptophan-Aminotransferase, Indol-3-pyruvat Decarboxylase und Indol-3-acetaldehyd Oxidase in der Regel in einem Multienzymkomplex vor. (Bartel, B. (1997), Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 51 - 66; Müller,

40 A., Weiler, E.W., (2000), Planta 211, 855 - 863). In Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe und Spezies sind aber auch andere untergeordnete Biosynthesewege beschrieben (; Normanly, J., Bartel, B. (1999), Current Opinion in Plant Biology 2, 207 - 213).

45 Zur Herstellung einer 2,ω-Diaminocarbonsäureverbindungen der Formel I wird man in der Regel eine Verbindung der Formel II,

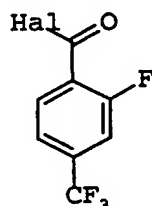
5



(II)

10 worin A und  $X^\ominus$  für ein einwertiges Anion oder ein Anionenäquivalent, z.B.  $Cl^\ominus$ ,  $Br^\ominus$  oder  $1/2 SO_4^{2\ominus}$  einer Mineralsäure, z.B.  $Cl^\ominus$ ,  $Br^\ominus$  oder  $1/2 SO_4^{2\ominus}$ , steht, mit einem aromatischen Säurehalogenid der Formel III

15



(III)

20

25 worin Hal für Chlor, Brom oder Iod steht, umsetzen. Die aromatischen Säurehalogenide III sind bekannt und zum Teil kommerziell erhältlich oder können nach bekannten Verfahren hergestellt werden.

Vorzugsweise wird die Umsetzung der Verbindung II mit der Verbindung III in Gegenwart einer Base durchgeführt. Die Base dient zur Neutralisation der bei der Reaktion entstehenden Mineralsäure H-Hal und H-X. Vorzugsweise setzt man die Base in wenigstens äquimolarer Menge, insbesondere in einer Menge von 1 bis 3 Mol pro Mol zu neutralisierender Säure H-Hal und H-X ein.

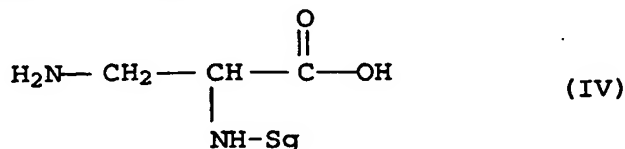
35 Vorzugsweise wird die Umsetzung der Verbindung II mit der Verbindung III in einem Lösungs- bzw. Verdünnungsmittel durchgeführt. Hierzu eignen sich Wasser, Diethylether, Tetrahydrofuran, Acetonitril, Essigsäureethylester, Dichlormethan oder Toluol.

40 Die Reaktionstemperaturen können über einen gewissen Bereich variiert werden, der durch die Stabilität des Säurechlorids III festgelegt wird. Bevorzugt arbeitet man bei Temperaturen im Bereich von 0 bis 30°C.

45 Die Aufarbeitung erfolgt nach üblichen Methoden z. B. indem man das Reaktionsgemisch mit kaltem Wasser versetzt, die organische Phase abtrennt und nach dem Trocknen unter vermindertem Druck einengt. Der Verbleibende Rückstand kann, falls erforderlich, in

üblicher Weise durch Chromatographie oder Kristallisation von eventuell vorhandenen Verunreinigungen befreit werden.

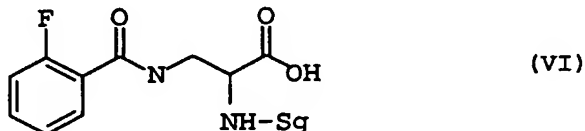
Die Verbindungen der Formel II lassen sich herstellen, indem man zunächst eine teilgeschützte 2, $\omega$ -Diaminocarbonsäure der Formel IV oder deren Säureadditionssalz,



worin Sg für eine Schutzgruppe steht, in einem ersten Schritt mit einem Säurehalogenid der Formel V



worin Hal für Chlor, Brom oder Iod steht, umgesetzt, in einem zweiten Schritt die dabei erhaltene Verbindung der Formel VI



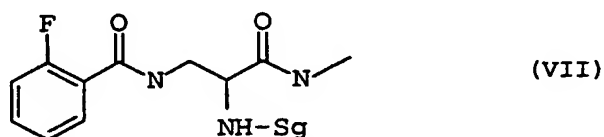
mit einem Amin der Formel  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  in Gegenwart eines geeigneten Kondensationsmittels umgesetzt und anschliessend die Schutzgruppe Sg entfernt.

Geeignete Schutzgruppen sind solche, die unter Bedingungen abgespalten werden können, welche nicht zu einer Spaltung der NH-X-Bindung in den Verbindungen der Formel VI führen. Geeignete Schutzgruppen sind aus der Peptidchemie bekannt. Hierzu zählen insbesondere Schutzgruppen, die unter Einwirkung von Säuren, die vorzugsweise eine Säurestärke oberhalb der Essigsäure aufweisen, abgespalten werden, z.B. die tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe, die 1-Adamantyloxycarbonyl-Gruppe und die 2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl-Gruppe.

Als Kondensationsmittel für die Umsetzung von Verbindung VI mit dem Amin  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  kommen alle Reagenzien in Frage, die freien Carboxylgruppen aktivieren können wie: Propanphosphonsäure-anhydrid (PPPA, H. Wissmann et al, Angew. Chem. 92, 129 (1980); H. Wissmann, Phosphorus, Sulfur 30, 645 (1986); M. Feigel, J. Am. Chem.

- Soc 108, 181 (1986)), N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrocholin (EEDQ, B. Belleau et al, J. Amer. Chem. Soc. 90, 1651 (1968)), Diphenylphosphorylazid (DPPA, Shun-ichi-Yamada et al, J. Am. Chem. Soc. 94, 6203 (1972)) und Diethylphosphorylcyanid (DEPC, Shun-ichi-Ymada et al, Tetrahedron Lett. 18, 1595 (1973)), Carbodiimide (Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Bd. 15/2, Seite 103-115, IV. Auflage, G. Thieme Verlag), um nur einige Kondensationsreagenzien beispielhaft zu nennen. Die dort beschriebenen Reaktionsbedingungen können auf die erfindungsgemäße Umsetzung von Verbindung VI mit dem Amin  $\text{HNR}_2\text{R}_3$  übertragen werden, so dass auf diese Druckschriften ebenfalls Bezug genommen wird.

- Die Entfernung der Schutzgruppe Sg, z.B. der tert.-Butoxycarbonyl-(BOC)-Gruppe, aus den dabei erhaltenen Verbindungen VII



- worin Sg die zuvor genannten Bedeutungen aufweist, erfolgt in der Regel mit einer Säure, vorzugsweise mit Hilfe von Trifluoressigsäure z.B. nach den von B. Lundt et al, Int. J. Pept. Protein Res., 12, 258 (1978)) beschriebenen Methoden oder z.B. mit 2N Chlorwasserstoff in Dioxan nach den von R. Andruszkiewicz et al, J. Med. Chem. 30, 1715 (1987)) beschriebenen Methoden und liefert in guten Ausbeuten die oben aufgeführten, erfindungsgemäßen Zwischenprodukte der Formel (II).
- Die dabei als Ausgangsverbindungen eingesetzten Carbonsäure- und Sulfonsäurehalogenide III und V sind bekannt oder lassen sich nach bekannten Methoden herstellen.
- 2-N-geschützten 2,ω-Diaminosäuren wie Verbindung IV sind ebenfalls bekannt, kommerziell erhältlich oder können nach bekannten Methoden hergestellt werden, z.B. nach N. Kucharczyk et al, Synth. Commun. 19, 1603 (1989); M. Waki et al, Synthesis, 266 (1981) und Lin-Hua Zhang et al, J. Org. Chem. 62, 6918 (1997).
- Die Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung umfassen die folgenden Schritte:
- a) Inkontaktbringen von einem oder mehreren Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase mit einer oder mehreren Testsubstanzen unter Bedingungen, die die Bindung der Testsubstanz(en) an eines der

vorstehend genannten Enzyme oder an die Nukleinsäuresequenz, die eines vorstehend genannten Enzyme kodiert, erlauben; und

- b) Nachweis, ob die Testsubstanzen die Transkription, Translation oder Expression von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren; oder
- c) Nachweis, ob die Testsubstanzen die Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren; oder
- d) Nachweis, ob die Testsubstanz an eines der vorstehend genannten Enzyme bindet.

Unter Reduktion oder Blockade der Transkription, Expression, Translation oder der Aktivität in Schritt b) und c) ist eine signifikante Abnahme im Vergleich zur Transkription, Expression, Translation oder der Aktivität bestimmt in Vergleich einem Verfahren, welches sich vom vorstehend genannten Verfahren dadurch unterscheidet, daß man keine Testsubstanz hinzufügt.

Unter einer signifikanten Abnahme ist eine Abnahme von mindestens 10 %, vorteilhaft mindestens 20 %, bevorzugt mindestens 30 %, besonders bevorzugt um mindestens 50 % und ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % bis zu 100 % zu verstehen.

Der Nachweis gemäß Schritt b) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von dem Fachmann bekannten Blotting Methoden erfolgen.

Der Nachweis gemäß Schritt d) des oben stehenden Verfahrens kann anhand von Techniken, welche die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand aufzeigen, detektieren, erfolgen. Hierbei sind insbesondere fünf bevorzugte Ausführungsformen zu nennen, die in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch für Hochdurchsatzmethoden (High Trough Put Screening, HTS) geeignet sind:

1. Über Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 11753-11575) läßt sich die durchschnittliche Diffusionsrate eines Fluoreszenzmoleküls in Abhängigkeit zur Masse in einem kleinen Probenvolumen bestimmen. Durch Messen der Massenänderung bzw. der daraus resultierenden veränderten Diffusionsrate einer Testverbindung beim Binden an das Enzym läßt sich FCS zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen einsetzen. Ein Testsystem kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung aufgebaut werden. Alternativ kann das Testsystem so konzipiert sein, dass eine

durch ein Fluoreszenzmolekül markierte chemische Referenzverbindung durch weitere Testverbindungen verdrängt wird ("Verdrängungsassay"). Die so identifizierten, an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

5

2. Die Fluoreszenzpolarisation nutzt die Eigenschaft eines mit polarisiertem Licht angeregten ruhenden Fluorophors ebenfalls wieder polarisiertes Licht zu emittieren. Kann der Fluorophor allerdings während des angeregten Zustands rotieren, so geht die Polarisation des emittierten Fluoreszenzlichts mehr oder weniger verloren. Bei sonst gleichen Bedingungen (z.B. Temperatur, Viskosität, Lösungsmittel) ist die Rotation eine Funktion der Molekülgröße, womit man über das Messsignal eine Aussage über die Größe des am Fluorophor gebundenen Rests treffen kann (Methods in Enzymology 246 (1995), pp. 283-300). Ein Testsystem kann direkt zur Messung der Bindung einer durch ein Fluoreszenzmolekül markierten Testverbindung an das Enzym aufgebaut werden. Alternativ kann das Testsystem auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten, an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

10

15

20

25

30

35

40

45

3. Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer" (FRET) basiert auf der strahlungslosen Energieübertragung zwischen zwei räumlich benachbarten Fluoreszenzmolekülen unter geeigneten Bedingungen. Eine Voraussetzung ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Donormoleküls mit dem Anregungsspektrum des Akzeptormoleküls. Durch Fluoreszenzmarkierung des Enzyms und den auf Bindung Testverbindungen kann mittels FRET die Bindung gemessen werden (Cytometry 34, 1998, pp. 159-179). Alternativ kann das Testsystem auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Eine besonders geeignete Ausführungsform der FRET Technologie ist die "Homogenous Time Resolved Fluorescence" (HTRF), wie sie von Packard BioScience vertrieben wird. Die so identifizierten, an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

4. Surface Enhanced-Laser Desorption/Ionisation (SELDI) in Kombination mit einem Time of Flight Massenspektrometer (MALDI-TOF) ermöglicht die schnelle Analyse von Molekülen auf einem Träger und kann zur Analyse von Protein-Ligand Wechselwirkungen verwendet werden (Worral et al., (1998) Anal. Biochem. 70:750-756). In einer bevorzugten Ausführungsform immobilisiert man nun das Enzym auf einem geeigneten Träger und inkubiert diesen mit der Testverbindung. Nach einem oder mehreren geeigneten Waschschritten kann die an das Enzym zusätzlich gebundenen Moleküle der Testverbindung mittels der oben er-



wähnten Methodik detektieren und somit Inhibitoren selektieren. Die so identifizierten, an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

- 5 5. Die Messung von Oberflächen Plasmonenresonanz basiert auf der Änderung des Brechungsindex an einer Oberfläche beim Binden einer Testverbindung an ein auf besagter Oberfläche immobilisiertes Protein. Da die Änderung des Brechungsindex für eine definierte Änderung der Massenkonzentration an der Oberfläche quasi für alle Proteine und Polypeptide identisch ist, kann diese Methode prinzipiell auf jedes Protein angewendet werden (Lindberg et al. Sensor Actuators 4 (1983) 299-304; Malmquist Nature 361 (1993) 186-187). Die Messung kann beispielsweise mit Hilfe der von Biacore (Freiburg) vertriebenen auf Oberflächen-Plasmonenresonanz basierenden Analyseautomaten in einem Durchsatz von derzeit bis zu 384 Proben pro Tag durchgeführt werden. Ein Testsystem kann direkt zur Messung der Bindung einer Testverbindung an das erf.-Protein aufgebaut werden. Alternativ kann das Testsystem auch in Form des unter 1 beschriebenen "Verdrängungsassays" konzipiert sein. Die so identifizierten an das Enzym bindenden Verbindungen sind als Inhibitoren geeignet.

Sämtliche, über die oben genannten Verfahren identifizierten Substanzen können anschließend in einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahren auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Nachweises gemäß Schritt d) ist dadurch gekennzeichnet, dass man die zu testende Verbindung

- a) mit einem pflanzlichen Zelllysat, das mindestens eines der Enzyme Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase enthält, oder
- b) mit mindestens einem der Enzyme Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase, die entweder partiell oder vollständig gereinigt sind, versetzt und
- c) im Anschluß die enzymatische Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme im Vergleich zur Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme, die nicht mit einer Testverbindung versetzt wurden, ermittelt, wobei die Verbindungen selektiert werden, welche die enzima-

tische Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren.

- Die in Schritt (b) eingesetzte, partiell oder vollständig gerei-  
5 nigten Enzyme können aus pflanzlichen Zellen nach dem Fachmann  
bekannten Prozeduren erhalten werden, wie z.B. in Truelsen, T.A.  
(Physiol. Plant. 28 (1973) 67 - 70) beschrieben. Hierbei können  
sämtliche Pflanzenspezies, welche die Auxinbiosynthese über den  
Eingangs beschriebenen Stoffwechselweg realisieren, zur Isolation  
10 der Enzyme herangezogen werden. Beispielhaft, aber nicht ab-  
schließend seien hier genannt Vertreter aus der Familie der Legu-  
minosae (Fabaceae) wie Mungbohnen (*Vigna radiata*), Bohne (*Phaseo-  
lus vulgaris*) oder Erbse (*Pisum sativum*) sowie Vertreter aus der  
Familie der Gramineae (Poaceae) wie Mais (*Zea mays*). Weitere Ver-  
15 treter aus der Familie der Leguminosae sind dem Fachmann bekannt  
und beispielsweise in Strasburger "Lehrbuch der Botanik", Sitte,  
P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A., Gustav Fischer  
Verlag, Stuttgart beschrieben.
- 20 Zur Identifizierung von Verbindungen in Schritt (c) wird nach ei-  
ner Reaktionszeit die enzymatische Aktivität des entsprechenden  
Enzyms im Vergleich zur Aktivität der nicht gehemmten Enzyms er-  
mittelt. Hierbei werden Verbindungen selektiert, die eine signi-  
fikante Abnahme der enzymatischen Aktivität zur Folge haben.
- 25 Unter Reaktionszeit ist hier die Zeit zu verstehen, die man für  
die Durchführung eines Aktivitätstests bis zum Erhalt einer si-  
gnifikanten Aussage über eine Aktivität benötigt. Sie hängt so-  
wohl von der spezifischen Aktivität des im Test eingesetzten Pro-  
30 teins als auch von der verwendeten Methode und der Empfindlich-  
keit der verwendeten Geräte ab. Dem Fachmann ist die Ermittlung  
der Reaktionszeiten bekannt. Bei auf spektroskopischen Methoden  
basierenden Testsystemen liegen die Reaktionszeiten im allgemei-  
nen zwischen > 0 bis 120 Minuten.
- 35 Die Bestimmung der Aktivität kann durch Inkubation des jeweiligen  
Enzyms mit einem geeigneten Substrat erfolgen, wobei der Umsatz  
des Substrates oder der Anstieg des entstehenden Produktes spek-  
troskopisch verfolgt wird.
- 40 Beispielsweise können Tryptophan, Indol-3-pyruvat und In-  
dol-3-acetaldehyd als Substrate eingesetzt werden. Daneben können  
auch radioaktive Derivate oder mit chromophoren oder fluorophoren  
Gruppen modifizierte Derivate des Tryptophan, Indol-3-pyruvat und  
45 Indol-3-acetaldehyd in den Verfahren gemäß der vorliegenden Er-

findung eingesetzt werden, die zum Beispiel eine spektroskopische Bestimmung ermöglichen.

In Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat ergeben sich prinzipiell drei Verfahrensvarianten für die Bestimmung der Enzymatischen Aktivität:

Verfahrensvariante 1 a)-e):

10 Verwendet man Tryptophan als Substrat zur Bestimmung zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von mindestens einem der Enzyme ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydroxidase in Schritt (c) des Verfahrens I, so kann die enzymatische Aktivität über

- a) die Abnahme an L-Tryptophan; oder
  - b) die Zunahme an Indol-3-pyruvat; oder
  - 20 c) die Zunahme an Indol-3-acetaldehyd; oder
  - d) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder
  - 25 e) eine Kombination von mindestens zwei der Methoden (a) bis (d)
- ermittelt werden.

30 Verfahrensvariante 2 a)-d):

Verwendet man Indol-3-pyruvat als Substrat zur Bestimmung zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von einem oder beiden Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydroxidase in Schritt (c) des Verfahrens I, so kann die enzymatische Aktivität über

- a) die Abnahme an Indol-3-pyruvat; oder
- 40 b) die Zunahme an Indol-3-acetaldehyd; oder
- c) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder
- 45 d) eine Kombination von mindestens zwei der Methoden (a) bis (c)

ermittelt werden.

Verfahrensvariante 3 a)-c):

5 Verwendet man Indol-3-acetaldehyd als Substrat zur Bestimmung zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Indol-3-acetaldehydoxidase in Schritt (c) des Verfahrens I, so kann die enzymatische Aktivität über

- 10 a) die Abnahme an Indol-3-acetaldehyd; oder  
b) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder  
c) eine Kombination der Methoden (a) und (b)

15

ermittelt werden.

Hierbei richtet sich die Wahl der Verfahrensvariante aber auch die in den jeweiligen Verfahrensvarianten erwähnten Methodenkom-  
20 binationen nach der Zusammensetzung der für den Test eingesetzten Enzymlösung bzw. danach, welche enzymatische Aktivität zu bestimmen ist.

Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung die Enzyme  
25 Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase so sind folgende Methoden möglich: 1 a), 1 d), 1 e) ( $e=a+d$ ), 2 a), 2 c), 2 d) ( $d=a+c$ ) und 3 a), 3 b), 3 c) ( $c=a+b$ ).

30 Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Tryptophanaminotransferase und Indol-3-pyruvatdecarboxylase so sind folgende Methoden möglich: 1 a), 1 c), 1 e) ( $e=a+c$ ), 2 a), 2 b), 2 d) ( $d=a+b$ )

35 Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase so sind folgende Methoden möglich: 2 a), 2 c), 2 d) ( $d=a+c$ ) und 3 a), 3 b), 3 c) ( $c=a+b$ ).

40 Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Tryptophanaminotransferase so sind folgende Methoden möglich: 1 a), 1 b), 1 e) ( $e=a+b$ ).

Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Indol-3-py-  
45 ruvatdecarboxylase so sind folgende Methoden möglich: 2 a), 2 b), 2 d) ( $d=a+b$ )

Enthält die für die den Test eingesetzte Enzymlösung Indol-3-acetaldehydoxidase so sind folgende Methoden möglich: 3 a), 3 b), 3 c) ( $c=a+b$ ).

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform der oben genannten Verfahrensvarianten wird zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität eine Mischung aus den drei Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase verwendet, was wie oben stehend erwähnt folgende Testmethoden ermöglicht:
- 10 licht: 1 a), 1 d), 1 e) ( $e=a+d$ ), 2 a), 2 c), 2 d) ( $d=a+c$ ) und 3 a), 3 b), 3 c) ( $c=a+b$ ).

- Geeignete spektroskopische Methoden für die genannten Verfahren 1, 2 und 3 sind Massenspektroskopie oder UV-VIS-Spektroskopie, LC/
- 15 UV-VIS (Flüssigchromatographie/UV-Vis-Spektroskopie) oder UV-Vis-Spektroskopie). Insbesondere für die jeweiligen Verfahrensvarianten 1b), 1d), 1e), 2d) und 3c) eignet sich Massenspektroskopie wie LC/MS oder HPLC/MS oder diverse auf LC oder HPLC basierende Methoden in Verbindung mit Leitfähigkeitsmessungen, NMR-Messungen
- 20 oder Messungen des Brechungsindex, da diese die zeitgleiche Bestimmung unterschiedlicher Substanzen ermöglicht.

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die photometrische Bestimmung angelehnt an ein von Simpson, R.M. et al. (Planta 201
- 25 (1997) 71 - 77) und Truelsen, T.A. et al. (Phsiol. Plant. (1972) 26, 289 - 295) beschriebenes Verfahren, die massenspektroskopische Bestimmung angelehnt an ein von Simpson, R.M. et al. (Planta 201 (1997), 71 - 77) beschriebenes Verfahren.

- 30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zu- bzw. Abnahme von Tryptophan und/oder Indol-3-pyruvat und/oder die Zunahme von Indol-3-essigsäure und/oder Indol-3-buttersäure zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität photometrisch ermittelt.

- 35 Die photometrische Bestimmung kann beispielsweise durch die Zu- bzw. Abnahme an Indol-3-pyruvat bei der Wellenlänge  $\lambda = 328\text{nm}$  detektiert werden (Simpson, R.M., Nonhebel, H.M., Christie, D.L. (1997), Planta 201, 71 - 77, Truelsen, T.A. (1972), Phsiol. Plant., 26, 289 - 295).

40

Die Zu- oder Abnahme an Indol-3-essigsäure kann mittels Fluoreszenz detektiert werden ( $\text{Ex} = 254\text{nm}$ ;  $\text{Em} = 360\text{nm}$ ; nach Mazur H. et al, J. Appl. Phycology 13 (2001) 35-42).

- 45 Zudem können sämtliche, in den vorstehend genannten Verfahren identifizierten Inhibitoren der Enzyme in einem in vivo Aktivitätstest auf ihre herbizide Wirkung überprüft werden. Hierbei

wird die entsprechende Substanz zur Überprüfung der herbiziden Wirkung auf die entsprechende Schadpflanze appliziert.

Alle oben beschriebenen Verfahren werden im folgenden mit dem Begriff "erfindungsgemäßes Verfahren" beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann in einzelnen getrennten Verfahrensansätzen und/oder vorteilhaft gemeinsam oder besonders vorteilhaft in einem High-Throughput-Screening durchgeführt werden und zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung verwendet werden.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren können auch mehrere Testverbindungen eingesetzt werden. Wenn durch eine Gruppe von Testverbindungen eine Beeinflussung des Targets erfolgt, dann ist es entweder möglich, die einzelnen Testverbindungen direkt zu isolieren oder die Gruppe von Testverbindungen in verschiedene Untergruppen teilen, z.B. wenn sie aus einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten besteht, um so die Zahl der verschiedenen Testverbindungen im Testsystem zu reduzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren wiederholt man dann mit der einzelnen Testverbindung oder der entsprechenden Untergruppe von Testverbindungen. Abhängig von der Komplexität der Probe können die oben beschriebenen Schritte mehrmals wiederholt werden, vorzugsweise bis die gemäß der erfindungsgemäßen Methode identifizierte Untergruppe nur noch eine geringe Anzahl von Testverbindungen oder nur noch eine Testverbindung umfaßt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen identifiziert nach den erfindungsgemäßen Verfahren. Diese Verbindungen werden im folgenden "selektierte Verbindungen" genannt. Sie weisen ein Molekulargewicht von kleiner 1000 g/mol, vorteilhaft kleiner 900 g/mol, bevorzugt kleiner 800 g/mol, besonders bevorzugt kleiner 700 g/mol, ganz besonders bevorzugt kleiner 600 g/mol und einem Ki-Wert kleiner 1 mM auf.

Die über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen können natürlich auch in Form ihrer landwirtschaftlich brauchbaren Salze vorliegen.

Unter landwirtschaftlich brauchbaren Salzen kommen vor allem die Salze derjenigen Kationen oder die Säureadditionssalze derjenigen Säuren in Betracht, deren Kationen beziehungsweise Anionen die herbizide Wirkung der über die erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Verbindungen mit herbizider Wirkung nicht negativ beeinträchtigen.

Ferner können die selektierte Verbindungen sofern sie asymmetrisch substituierte  $\alpha$ -Kohlenstoffatome enthalten, entweder als Racemate, Enantiomerengemische, reine Enantiomere oder, sofern sie chirale Substituenten aufweisen, auch als Diastereomerengemische vorliegen.

Die selektierten Verbindungen können chemisch synthetisierte oder mikrobiologisch produzierte Stoffe sein und z.B. in Zellextrakten von z.B. Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen auftreten. Das Reaktionsgemisch kann ein zellfreier Extrakt sein oder eine Zelle oder Zellkultur umfassen. Geeignete Methoden sind dem Fachmann bekannt und werden z.B. allgemein beschrieben in Alberts, Molecular Biology the cell, 3<sup>rd</sup> Edition (1994), z.B. Kapitel 17.

Mögliche Testverbindungen können Expressionsbibliotheken wie z.B. cDNA-Expressionsbibliotheken, Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Antikörper, kleine organische Stoffe, Hormone, PNAs oder ähnliches sein (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell. 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell. 79 (1994), 193-198 und darin zitierte Referenzen).

Die selektierte Verbindungen können zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs sowie unter Umständen auch zur Defoliation, beispielsweise von Kartoffeln, oder Desikkation, beispielsweise von Baumwolle verwendet werden. Des weiteren können die selektierten Verbindungen ggf. auch zur Regulation des Wachstums von Pflanzen verwendet werden, da Inhibitoren der Biosynthese des Pflanzenhormons Auxins einen Einfluß auf das Wachstum der Pflanzen haben können. Agrochemische Zusammensetzungen, welche die selektierten Verbindungen enthalten, bekämpfen Pflanzenwuchs auf Nichtkulturflächen sehr gut, besonders bei hohen Aufwandsmengen. In Kulturen wie Weizen, Reis, Mais, Soja und Baumwolle wirken sie gegen Unkräuter und Schadgräser, ohne die Kulturpflanzen nennenswert zu schädigen. Dieser Effekt tritt vor allem bei niedrigen Aufwandsmengen auf. Die selektierten Verbindungen können zur Bekämpfung der oben bereits erwähnten Schadpflanzen verwendet werden.

In Abhängigkeit von der jeweiligen Applikationsmethode können selektierten Verbindungen bzw. diese enthaltende agrochemische Zusammensetzungen vorteilhaft noch in einer weiteren Zahl von Kulturpflanzen zur Beseitigung unerwünschter Pflanzen eingesetzt werden. In Betracht kommen beispielsweise folgende Kulturen:

Allium cepa, Ananas comosus, Arachis hypogaea, Asparagus officinalis, Beta vulgaris spec. altissima, Beta vulgaris spec. rapa, Brassica napus var. napus, Brassica napus var. napo-

brassica, Brassica rapa var. silvestris, Camellia sinensis, Carthamus tinctorius, Carya illinoensis, Citrus limon, Citrus sinensis, Coffea arabica (Coffea canephora, Coffea liberica), Cucumis sativus, Cynodon dactylon, Daucus carota, Elaeis  
5 guineensis, Fragaria vesca, Glycine max, Gossypium hirsutum, (Gossypium arboreum, Gossypium herbaceum, Gossypium vitifolium), Helianthus annuus, Hevea brasiliensis, Hordeum vulgare, Humulus lupulus, Ipomoea batatas, Juglans regia, Lens culinaris, Linum usitatissimum, Lycopersicon lycopersicum, Malus spec., Manihot  
10 esculenta, Medicago sativa, Musa spec., Nicotiana tabacum (N.rustica), Olea europaea, Oryza sativa, Phaseolus lunatus, Phaseolus vulgaris, Picea abies, Pinus spec., Pisum sativum, Prunus avium, Prunus persica, Pyrus communis, Ribes sylestre, Ricinus communis, Saccharum officinarum, Secale cereale, Solanum  
15 tuberosum, Sorghum bicolor (s. vulgare), Theobroma cacao, Tri- folium pratense, Triticum aestivum, Triticum durum, Vicia faba, Vitis vinifera, Zea mays.

Darüber hinaus können die selektierten Verbindungen auch in Kul-  
20 turen, die durch Züchtung einschließlich gentechnischer Methoden gegen die Wirkung von Herbiziden tolerant sind, verwandt werden.

Weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung der oben bereits erwähnten agrochemischen Zusammensetzung, da-  
25 durch gekennzeichnet dass man selektierten Verbindungen mit für die Formulierung geeigneten Hilfsmitteln formuliert.

Die selektierten Verbindungen können z.B. in Form von direkt ver-  
sprühbaren wässrigen Lösungen, Pulvern, Suspensionen, auch hoch-  
30 prozentigen wässrigen, öligen oder sonstigen Suspensionen bzw. Suspoemulsionen oder Dispersionen, emulgierbaren Konzentraten, Emulsionen, Öldispersionen, Pasten, Stäubemitteln, Streumitteln oder Granulaten formuliert werden und durch Versprühen, Verne-  
beln, Verstäuben, Verstreuen oder Gießen angewendet werden. Die  
35 Anwendungsformen richten sich nach den Verwendungszwecken und der Natur der selektierten Verbindungen und sollten in jedem Fall möglichst die feinste Verteilung der selektierten Verbindungen gewährleisten. Die agrochemischen Zusammensetzung enthalten eine herbizid wirksame Menge mindestens einer selektierten Verbindung  
40 und für die Formulierung von agrochemischen Zusammensetzungen übliche Hilfsstoffe.

Zur Herstellung von Emulsionen, Pasten oder wässrigen oder ölhal-  
tigen Formulierungen sowie dispergierbaren Konzentraten (DC) kön-  
45 nen die selektierten Verbindungen in einem Öl oder Lösungsmittel gelöst oder dispergiert werden, wobei weitere Formulierungshilfsstoffe zur Homogenisierung zugesetzt werden können. Es



können aber auch aus selektierter Verbindung, gegebenenfalls Lösungsmitteln oder Öl sowie optional weiteren Hilfsmitteln bestehende flüssige oder feste Konzentrate hergestellt werden, die zur Verdünnung mit Wasser geeignet sind. Hier zu nennen sind emulgierbare Konzentrate (EC, EW), Suspensionen (SC), lösliche Konzentrate (SL), dispergierbaren Konzentrate (DC), Pasten, Pastillen netzbaren Pulvern oder Granulaten, wobei die festen Formulierungen entweder in Wasser löslich (soluble) oder dispergierbar (wetttable) sein können. Desweiteren können entsprechende Pulver bzw. Granulate oder Tabletten noch mit einem festen, den Abrieb oder eine vorzeitige Wirkstofffreisetzung verhinderenden Überzug ("coating") versehen werden.

Prinzipiell sind unter dem Begriff Hilfsmittel folgende Substanzklassen zu verstehen: Antischäumungsmittel, Verdicker, Netz-, Haftmittel, Dispergiermittel, Emulgiermittel, Bakterizide und/oder thixotrophe Agentien. Die Bedeutung der oben genannten Mittel ist dem Fachmann bekannt.

SLs, EWs und ECs können durch einfaches Mischen der entsprechenden Inhaltsstoffe hergestellt werden, Pulver über Mischen oder Vermahlen in speziellen Mühlentypen (z.Bsp. Hammermühlen). DC, SCs und SEs werden üblicherweise über Naßvermahlung ("wet milling") hergestellt, wobei ein SE aus einem SC durch Zugabe einer organischen Phase, die weitere Hilfsmittel oder selektierte Verbindungen enthalten kann, hergestellt werden kann. Die Herstellung ist bekannt. Pulver-, Streu- und Stäubemittel können vorteilhaft durch Mischen oder gemeinsames Vermahlen der wirksamen Substanzen mit einem festen Trägerstoff hergestellt werden. Granulate, z.B. Umhüllungs-, Imprägnierungs- und Homogengranulate können durch Bindung der selektierten Verbindungen an feste Trägerstoffe hergestellt werden. Weitere Details der Herstellung sind dem Fachmann bekannt, und z.Bsp. in folgenden Schriften aufgeführt: US 3,060,084, EP-A 707445 (für flüssige Konzentrate), Browning, "Agglomeration", Chemical Engineering, Dec. 4, 1967, 147-48, Perry's Chemical Engineer's Handbook, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, 1963, pages 8-57 und ff. WO 91/13546, US 4,172,714, US 4,144,050, US 3,920,442, US 5,180,587, US 5,232,701, US 5,208,030, GB 2,095,558, US 3,299,566, Klingman, Weed Control as a Science, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, Hance et al., Weed Control Handbook, 8th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989 und Mollet, H., Grubemann, A., Formulation technology, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (Federal Republic of Germany), 2001.

Inerte flüssige und/oder feste Trägerstoffe geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. flüssige Zusatzstoffe wie Mineralölfractionen von mittlerem bis hohem Siedepunkt, wie Kerosin oder Dieselöl, 5 ferner Kohlenteeröle sowie Öle pflanzlichen oder tierischen Ursprungs, aliphatische, cyclische und aromatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Tetrahydronaphthalin, alkylierte Naphthaline oder deren Derivate, alkylierte Benzole oder deren Derivate, Alkohole wie Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Cyclohexanol, 10 Ketone wie Cyclohexanon oder stark polare Lösungsmittel, z.B. Amine wie N-Methylpyrrolidon oder Wasser.

Feste Trägerstoffe sind beispielsweise Mineralerden wie Kieselsäuren, Kieselgele, Silikate, Talkum, Kaolin, Kalkstein, Kalk, 15 Kreide, Bolus, Löß, Ton, Dolomit, Diatomeenerde, Calcium- und Magnesiumsulfat, Magnesiumoxid, gemahlene Kunststoffe, Düngemittel, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumphosphat, Ammoniumnitrat, Harnstoffe und pflanzliche Produkte wie Getreidemehl, Baumrinden-, Holz- und Nußschalenmehl, Cellulosepulver oder andere feste Trägerstoffe.

20 Oberflächenaktive Stoffe (Tenside) geeignet für die erfindungsgemäßen Formulierungen sind dem Fachman in einer Vielzahl bekannt, wie z.Bsp. Alkali-, Erdalkali-, Ammoniumsalze von aromatischen Sulfonsäuren, z.B. Lignin-, Phenol-, Naphthalin- und Dibutyl-naphthalinsulfonsäure, sowie von Fettsäuren, Alkyl- und Alkylarylsulfonaten, Alkyl-, Laurylether- und Fettalkoholsulfaten, sowie Salze sulfatierter Hexa-, Hepta- und Octadecanolen sowie von Fettalkoholglykolether, Kondensationsprodukte von sulfoniertem Naphthalin und seiner Derivate mit Formaldehyd, Kondensationsprodukte 30 des Naphthalins bzw. der Naphthalinsulfonsäuren mit Phenol und Formaldehyd, Polyoxyethylenoctylphenolether, ethoxyliertes Isooctyl-, Octyl- oder Nonylphenol, Alkylphenyl-, Tributylphenylpolyglykolether, Alkylarylpolyetheralkohole, Isotridecylalkohol, Fettalkoholethylenoxid-Kondensate, ethoxyliertes Rizinusöl, Poly- 35 oxyethylenalkylether oder Polyoxypropylenalkylether, Laurylalkoholpolyglykoletheracetat, Sorbitester, Lignin-Sulfitablaugen oder Methylcellulose.

Die Applikation der agrochemischen Zusammensetzungen bzw. der 40 selektierten Verbindungen kann im Vorauf- oder im Nachauf-  
laufverfahren erfolgen. Sind die selektierten Verbindungen für gewisse Kulturpflanzen weniger verträglich, so können Ausbringungstechniken angewandt werden, bei welchen die selektierten Verbindungen mit Hilfe der Spritzgeräte so gespritzt werden, daß 45 die Blätter der empfindlichen Kulturpflanzen nach Möglichkeit nicht getroffen werden, während die selektierten Verbindungen auf

die Blätter darunter wachsender unerwünschter Pflanzen oder die unbedeckte Bodenfläche gelangen (post-directed, lay-by).

Die Aufwandmengen an selektierten Verbindungen betragen je nach  
5 Bekämpfungsziel, Jahreszeit, Zielpflanzen und Wachstumsstadium  
0.001 bis 3.0, vorzugsweise 0.01 bis 1.0 kg/ha.

Die Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter  
veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefaßt werden  
10 sollten.

Beispiel 1 - Enzymisolierung der Tryptophanaminotransferase (TA-  
Tase) aus etiolierten Mungbohnen (nach Simpson, R.M., Nonhebel,  
H.M., Christie, D.L. (1997), Planta 201, 71 - 77)

15

Die Mungbohnen ( *Vigna radiata* ) werden für 6-7 Tage in Vermicu-  
lite im Dunkeln angezogen. Die Pflanzen sind zum Erntezeitpunkt  
ca. 8 cm hoch.

20 Sämtliche folgenden Arbeitsschritte finden bei 4°C statt. 100g  
frisch geerntetes Pflanzenmaterial wird bei 4°C mit 100 ml Extrak-  
tionspuffer (50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.5; 0.5mM EDTA; 0.5mM MnCl<sub>2</sub>; 10mM  
Isoascorbat) in 2 Schritten von je 1 min mit einem Mixer homoge-  
nisiert. Danach wird 5 g Polyvinylpolypyrrolidon zugesetzt (Ver-  
25 hältnis Pflanzenmat./ PVPP 100 : 5 ), 5 min gerührt, anschließend  
über 8 lagige Gaze filtriert. Nach Zentrifugation des Filtrates  
(20000g, 4°C, 20min; SL-250 T Rotor - Sorvall Super T 1 Zentri-  
fuge) wird der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfäl-  
lung (60%, 80%). Der verbleibende Überstand wird verworfen, das  
30 Pellet mit 3ml Säulenpuffer (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1M NaCl)  
resuspendiert und auf ein Gesamtvolumen von 5,0 ml gebracht und  
über eine äquilibrirte PD 10 Säule (Amersham Pharmacia) ent-  
salzt. Die entsalzte Enzymlösung wird je nach Verwendung portio-  
nsweise bei -20°C eingefroren, kann aber je nach Bedarf auch di-  
35 rekt in den Enzymassay eingesetzt werden.

#### Beispiel 2 - Enzymassay

In einem geeigneten Gefäß werden 500µl Assaypuffer (0.1M Borax, pH  
40 8,5; 10mM Tryptophan, 0.5mM Na-Arsenat, 0.5mM EDTA, 50µM Pyrodo-  
xalphosphat), 100µl einer frisch angesetzten 10mM α-Ketoglutarat-  
lösung und ca. 50-250µl Enzymlösung (5mg/ml) eingesetzt. Man er-  
gänzt den Assay mit Wasser sowie 10µl Wirkstofflösung ad 1 ml,  
wobei die zugegebene Menge an Wirkstofflösung zwischen 1-5% des  
45 Gesamtansatzvolumens liegen und 1mM nicht überschreiten sollte,  
und inkubiert 30 Minuten unter Schütteln bei 60°C. Anschließend  
wird die Reaktion mit 150µl Methanol gestoppt und die Probe bei

20000g / 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird mittels LCMS - Methode analysiert, wobei die folgenden Geräte/Parameter verwendet werden (hier sollte doch die Angabe des Gerätetypes alle weiteren Parameter überflüssig machen):

5

Geräte: Pumpen Bio-Tek 522 und 520  
Säulenthermostat Bio-Tek 582  
Autosampler Bio-Tek 560  
UV-Detektor Bio-Tek 535  
10 Massendetektor Applied Biosystems Mariner

Säule: Phenomenex Aqua 3µ C18 125 A, 150 x 2 µm  
Flußrate: 0,3 ml/min  
Laufmittel: Puffer A: 0,2% Essigsäure  
15 Puffer B: Methanol

verwendeter Gradient: 0 - 30 min 75% auf 50% linear Puffer A  
30 - 35 min 50% Puffer A  
35 - 40 min 50% auf 75% linear Puffer A  
20 40 - 45 min 75 % Puffer A

UV-Detektor: 280 nm

25

Die für die Auswertung benötigten Retentionszeiten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt:

Tabelle 1

30

Verbindung	Retentionszeiten:
L-Tryptophan	3,8 min
Indol-3-essigsäure	23,7 min
Indol-3-pyruvat	35,2 min 42,5 min *)

35

\*) hierbei handelt es sich um Ketoenolautomerie

#### Beispiel 3 - Herbizide Wirkung von Verbindung I

40 Die herbizide Wirkung der Verbindung I ließ sich durch Gewächshausversuche zeigen:

Als Kulturgefäße dienten Plastiktöpfe mit lehmigem Sand mit etwa 3,0% Humus als Substrat. Die Samen der Testpflanzen wurden nach

45 Arten getrennt eingesät.

Bei Voraufaufbehandlung wurden die in Wasser suspendierten oder emulgierten Wirkstoffe direkt nach Einsaat mittels fein verteiler D sen aufgebracht. Die Gefäße wurden leicht beregnet, um Keimung und Wachstum zu fördern, und anschließend mit durchsichtigen Plastikhauben abgedeckt, bis die Pflanzen angewachsen waren. Diese Abdeckung bewirkt ein gleichmäßiges Keimen der Testpflanzen, sofern dies nicht durch die Wirkstoffe beeinträchtigt wurde.

- 10 Zum Zweck der Nachaufaufbehandlung wurden die Testpflanzen je nach Wuchsform erst bis zu einer Wuchshöhe von 3 bis 15 cm angezogen und dann mit den in Wasser suspendierten oder emulgierten Wirkstoffen behandelt. Die Testpflanzen wurden dafür entweder direkt gesät und in den gleichen Gefäßen aufgezogen oder sie wurden  
15 erst als Keimpflanzen getrennt angezogen und einige Tage vor der Behandlung in die Versuchsgefäße verpflanzt. Die Aufwandmenge für die Nachaufaufbehandlung betrug 3 kg a.S./ha.

- Die Pflanzen wurden artenspezifisch bei Temperaturen von 10 - 25 C  
20 bzw. 20 - 35 C gehalten. Die Versuchsperiode erstreckte sich über 2 bis 4 Wochen. Während dieser Zeit wurden die Pflanzen gepflegt, und ihre Reaktion auf die einzelnen Behandlungen wurde ausgewertet.

- 25 Bewertet wurde nach einer Skala von 0 bis 100. Dabei bedeutet 100 kein Aufgang der Pflanzen bzw. völlige Zerstörung zumindest der oberirdischen Teile und 0 keine Schädigung oder normaler Wachstumsverlauf.

- 30 Die in den Gewächshausversuchen verwendeten Pflanzen setzten sich aus folgenden Arten zusammen:

	Lateinischer Name	Deutscher Name	Englischer Name
35	Chenopodium album	We��er G�nsefu�	common lambsquarters
	Echinochloa crus-galli	H�hnerhirste	cockspur(grass)
	Pharbitis purpurea	Purpurtrichterwinde	Moringglory, common

- Die Verbindung I zeigte im Nachaufauf eine sehr gute herbizide  
40 Wirksamkeit gegen Chenopodium album, Echinochloa crus-galli und Pharbitis purpurea bei Aufwandmengen von 1.0 kg/ha a.S.

Beispiel 4 - Enzymassay zur Suche nach Hemmstoffen der Indol-3-essigsäure (IES, Auxin) Biosynthese

Zur Gewinnung des Enzymextraktes, wurden 2g eingefrorene, mit flüssigem Stickstoff gemörserte Pflanzensprosse von *Chenopodium album* (Weißer Gänsefuß) in 3ml 100mM EPPS-Extraktionspuffer (5mM Dithiothreitol, 6µM Pyridoxalphosphat, 10µM Leupeptin, 10µM Pefabloc SC, pH 8,5) zusammen mit einer Spatelspitze Polyvinylpyrrolidon über 30min unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurde das Pflanzenmaterial für 10min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand auf einer Sephadex G-25 Säule (voräquilibriert mit 5mM EPPS-Elutionspuffer (1mM Dithiothreitol, 6µM Pyridoxalphosphat, 10µM Pefabloc SC, pH 8,5) entsalzt. Der erhaltene Enzymextrakt (400µl) wurde unter Zugabe von 100µl EPPS-Extraktionspuffer und 6µl Wirkstofflösung (10mM Verbindung I in DMSO) im Testassay (600µl Volumen) in Gegenwart von 20µM Pyridoxalphosphat, 80mM EPPS-Extraktionspuffer, 50µM L-Tryptophan, 50µM α-Ketoglutarat und 50µM Indol für 2h bei 37°C inkubiert. Der Kontrolle ohne Verbindung I wurde die entsprechende Menge DMSO zugesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20µl 7,2N HCl und 3ml Ethylacetat abgestoppt. Die Kontroll-assays ohne Inkubation wurden sofort nach Ansatz auf Eis mit HCl und Ethylacetat behandelt. Nach nochmaliger Extraktion mit 3ml Ethylacetat werden die organischen Phasen (6ml) vereinigt, unter Stickstoffstrom aufkonzentriert und die Proben mit Diazomethan methyliert. Dadurch wurde die im Probenmaterial vorhandene Indol-3-essigsäure in Indol-3-essigsäure-Methylester (IES-Me) überführt. IES-Me wurde anschließend immunoanalytisch durch monoklonale Antikörper (100% reaktiv gegen IES-Me) quantifiziert (nach Weiler E.W., Eberle J., Mertens R., Atzorn R., Feyerabend M., Jourdan P.S., Arnscheidt A., Wieczorek U., in: Immunology in Plant Science (Wang T.L., Ed.), Society for Experimental Biology, Seminar Series 29, Cambridge University Press, Cambridge, 1986, pp. 27-58) und als Maß für die Enzymaktivitäten bestimmt. Die Hemmung der Indol-3-essigsäure (IES)-Synthesereaktion durch Verbindung 1 ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

	pMol IES-Me/g Sprossfrischmasse <sup>2</sup>	Hemmung [%] 1
Kontrolle ohne Inkubation	48,7 +/- 4,5	
Kontrolle mit Inkubation	445,3 +/- 33,9	0
Assay mit Inkubation und 100µM Verbindung I	156,0 +/- 14,8	73

<sup>1</sup> Zur Berechnung der % Hemmung wird von den Werten der Kontrollwert ohne Inkubation subtrahiert.

<sup>2</sup> Mittelwert aus drei Messungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verwendung von einem oder mehreren Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase in einem Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen mit herbizider Wirkung.
2. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit herbizider Wirkung umfassend die folgenden Schritte:
  - a) Inkontaktbringen von einem oder mehreren Enzymen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Enzymen Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase mit einer oder mehreren Testsubstanzen unter Bedingungen, die die Bindung der Testsubstanz(en) an eines der vorstehend genannten Enzyme oder an die Nukleinsäuresequenz, die eines vorstehend genannten Enzyme kodiert, erlauben; und
  - b) Nachweis, ob die Testsubstanzen die Transkription, Translation oder Expression von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren; oder
  - c) Nachweis, ob die Testsubstanzen die Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren; oder
  - d) Nachweis, ob die Testsubstanz an eines der vorstehend genannten Enzyme bindet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass man die Testverbindung
  - a) mit einem pflanzlichen Zelllysate, das mindestens eines der Enzyme Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase enthält; oder
  - b) mit mindestens einem der Enzyme Tryptophanaminotransferase, Indol-3-pyruvatdecarboxylase und Indol-3-acetaldehydoxidase, die entweder partiell oder vollständig gereinigt sind, versetzt und



- 5 c) im Anschluß die enzymatische Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme im Vergleich zur Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten, nicht mit einer Testverbindung versetzten Enzyme ermittelt, wobei die chemischen Verbindungen selektiert werden, welche die Aktivität von mindestens einem der vorstehend genannten Enzyme reduzieren oder blockieren.
- 10 4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 3 dadurch gekennzeichnet, dass man als Enzym Tryptophanaminotransferase einsetzt.
- 15 5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man Tryptophan oder ein Derivat des Tryptophans als Substrat einsetzt und die enzymatischen Aktivität in Schritt (c) über
- 20 a) die Abnahme an L-Tryptophan; oder
- b) die Zunahme an Indol-3-pyruvat; oder
- 25 c) die Zunahme an Indol-3-acetaldehyd; oder
- d) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder
- e) die Zunahme an Indol-3-buttersäure; oder
- 30 f) eine Kombination von mindestens zwei der Methoden (a) bis (e)
- ermittelt.
- 35 6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man Indol-3-pyruvat oder ein Derivat des Indol-3-pyruvats als Substrat einsetzt und die enzymatischen Aktivität in Schritt (c) über
- 40 a) die Abnahme an Indol-3-pyruvat; oder
- b) die Zunahme an Indol-3-acetaldehyd; oder
- 45 c) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder
- d) die Zunahme an Indol-3-buttersäure; oder
- e) eine Kombination von mindestens zwei der Methoden (a) bis (d)

ermittelt.

7. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man Indol-3-acetaldehyd oder ein Derivat des Indol-3-acetaldehyds als Substrat einsetzt und die enzymatische Aktivität in Schritt (c) über
- a) die Abnahme an Indol-3-acetaldehyd; oder
- b) die Zunahme an Indol-3-essigsäure; oder
- c) eine Kombination der Methoden a) und b)
- ermittelt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der enzymatischen Aktivität spektroskopisch erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Identifizierung der Substanzen in einem High-Throughput-Screening durchgeföhrt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die über das Verfahren ausgewählte Verbindung zur Verifizierung der herbiziden Wirkung auf eine Pflanze appliziert wird.
11. Verbindungen mit herbizider oder wachstumsregulatorischer Wirkung identifiziert über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 10.
12. Verfahren zur Herstellung einer agrochemischen Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet dass man
- i. einen Wirkstoff über eines der Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 10 identifiziert, und
- ii. diesen Wirkstoff mit für die Formulierung von agrochemischen Zusammensetzungen geeigneten Hilfsmitteln formuliert.
13. Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine wirksame Menge mindestens einer Verbindung nach Anspruch 11 oder eine agrochemische Zusammensetzung erhältlich über das in Anspruch 12 genannte Verfahren

auf Pflanzen, deren Lebensraum und/oder auf Samen einwirken läßt.

14. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 11 oder einer agro-  
5 chemischen Formulierung erhältlich über das in Anspruch 12  
genannte Verfahren zur Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzen-  
wuchs und/oder zur Regulation des Wachstums von Pflanzen ge-  
mäß Anspruch 13.

10

15

20

25

30

35

40

45

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/02846

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/527 C12Q1/48 A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, CHEM ABS Data, COMPENDEX, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 834 558 A (SUMITOMO CHEMICAL CO) 8 April 1998 (1998-04-08) Seite 5, Zeilen 19 - 23; Anspruch 1 ---	11-14
X	TEKTRAN, 'Online! 18 December 1998 (1998-12-18), page 1 XP002250542 Retrieved from the Internet: <URL:www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/00 0009/25/0000092559.html> 'retrieved on 2003-08-05! page 1 --- -/--	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 August 2003

Date of mailing of the international search report

22/08/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2260 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thiele, U

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/02846

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TERZIIIVANOVA-DIMOVA SULTANA D ET AL:            "Enzymes of auxin biosynthesis and their regulation: I. Tryptophan and phenylalanine aminotransferase in pea plants."            BIOLOGIA PLANTARUM (PRAGUE),            vol. 33, no. 4, 1991, pages 277-286,            XP009015280            ISSN: 0006-3134            Kapitel überschrieben "Determination of L-trp transamination activity" und "Effect of indoles on the L-trp and L-phe transamination"</p> <p>---</p>	11
X	<p>ILIC NEBOJSA ET AL: "Differential inhibition of indole-3-acetic acid and tryptophan biosynthesis by indole analogues. I. Tryptophan dependent IAA biosynthesis."            PLANT GROWTH REGULATION,            vol. 27, no. 1, January 1999 (1999-01),            pages 57-62, XP009015281            ISSN: 0167-6903            Figur 2; Seite 62, linke Spalte, vorletzter Satz</p> <p>---</p>	11
A	<p>BOTANY 512, 'Online! pages 1--9,            XP002250543            Retrieved from the Internet:            &lt;URL:www.public.iastate.edu/{bot.512/lectures/auxin_metabolism.pdf}&gt;            'retrieved on 2003-08-05!</p> <p>---</p>	
A	<p>BARTEL BONNIE: "Auxin biosynthesis."            ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY,            vol. 48, 1997, pages 51-66, XP009015339            1997 Annual Reviews Inc. P.O. Box 10139,            4139 El Camino Way, Palo Alto, California 94306, USA            ISBN: 0-8243-0648-1            figure 1</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
**PCT/EP03/02846**

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: **11-14**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**see supplemental sheet FURTHER INFORMATION**  
**PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box I.2Claims 11-14

The current Claim 11 relates to a product which is characterised by a desirable attribute or property, namely a herbicidal or growth-regulating effect. The product is characterised only by the method by which it is identified rather than by technical features pertaining to its structure. The claims therefore cover all products that display this attribute or property (including as yet undiscovered compounds and also structurally similar compounds which are already known but whose herbicidal attributes or properties had previously remained unnoticed or undiscovered), whereas the description in the application supports only a limited number of such products in the sense indicated by PCT Article 5. In the present instance the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the full scope of protection sought. Irrespective of this, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product in terms of the desired results. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the full scope of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts relating to the products with the structure according to formula (I) as specified on page 2 of the description.

These objections apply equally to Claims 12-14, which refer back to Claim 11.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/02846

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0834558	A	08-04-1998	JP 10108680 A	28-04-1998
			CA 2217136 A1	04-04-1998
			EP 0834558 A2	08-04-1998
<hr/>				



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/02846

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/527 C12Q1/48 A61P43/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE, CHEM ABS Data, COMPENDEX, INSPEC

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	EP 0 834 558 A (SUMITOMO CHEMICAL CO) 8. April 1998 (1998-04-08) Seite 5, Zeilen 19 - 23; Anspruch 1 ---	11-14
X	TEKTRAN, 'Online! 18. Dezember 1998 (1998-12-18), Seite 1 XP002250542 Gefunden im Internet: <URL:www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/00 0009/25/0000092559.html> 'gefunden am 2003-08-05! Seite 1 ----- -/--	1-14

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussteilung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*S\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. August 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/08/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Thiele, U

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>TERZIIVANOVA-DIMOVA SULTANA D ET AL:  "Enzymes of auxin biosynthesis and their regulation: I. Tryptophan and phenylalanine aminotransferase in pea plants."  BIOLOGIA PLANTARUM (PRAGUE),  Bd. 33, Nr. 4, 1991, Seiten 277-286,  XP009015280  ISSN: 0006-3134  Kapitel überschrieben "Determination of L-trp transamination activity" und "Effect of indoles on the L-trp and L-phe transamination"</p>	11
X	<p>ILIC NEBOJSA ET AL: "Differential inhibition of indole-3-acetic acid and tryptophan biosynthesis by indole analogues. I. Tryptophan dependent IAA biosynthesis."  PLANT GROWTH REGULATION,  Bd. 27, Nr. 1, Januar 1999 (1999-01),  Seiten 57-62, XP009015281  ISSN: 0167-6903  Figur 2; Seite 62, linke Spalte, vorletzter Satz</p>	11
A	<p>BOTANY 512, 'Online! Seiten 1--9,  XP002250543  Gefunden im Internet:  &lt;URL:www.public.iastate.edu/{bot.512/lectures/auxin_metabolism.pdf}&gt;  'gefunden am 2003-08-05!</p>	
A	<p>BARTEL BONNIE: "Auxin biosynthesis."  ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY,  Bd. 48, 1997, Seiten 51-66, XP009015339  1997 Annual Reviews Inc. P.O. Box 10139,  4139 El Camino Way, Palo Alto, California 94306, USA  ISBN: 0-8243-0648-1  Abbildung 1</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/02846

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 11-14  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 11-14

Der geltenden Patentanspruch 11 beziehen sich auf ein Produkt, das durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich herbizide oder wachstumsregulatorische Wirkung, charakterisiert ist. Das Produkt ist nicht durch strukturelle technische Merkmale charakterisiert sondern lediglich durch das Verfahren zu seiner Identifizierung. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen (darunter noch zu entdeckende Verbindungen sowie strukturgleiche, bereits bekannte Verbindungen, deren herbicide Eigenschaft bisher jedoch unbemerkt/unentdeckt blieb), wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend das Produkte mit der Struktur (I) auf Seite 2 der vorliegenden Beschreibung.

Die erhobenen Einwände gelten in gleichem Masse für Ansprüche 12 - 14, die sich auf Anspruch 11 rückbeziehen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/02846

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0834558 A	08-04-1998	JP 10108680 A	28-04-1998
		CA 2217136 A1	04-04-1998
		EP 0834558 A2	08-04-1998
<hr/>			